

慢病毒载体转化指南

版本：2.0 | 有效期：见标签 | 储存条件：-20℃

一、产品信息

质粒名称：见标签

浓度：100 ng/μL

体积：10 μL (总量 1 μg)

储存条件：-20℃避光保存，避免反复冻融（冻融超过3次可能导致质粒断裂）。

二、实验前准备

1. 关键材料与设备

感受态细胞：

必须使用STABLE感受态大肠杆菌（推荐Stbl3或Stbl4菌株），因其缺失重组酶（如recA-），可抑制慢病毒载体中重复序列（如LTR）的同源重组。

转化效率要求：≥1×10⁶ CFU/μg质粒，使用前确认厂家说明书。

培养基：

LB液体培养基：10 g胰蛋白胨、5 g酵母提取物、10 g NaCl，溶解于1 L纯水，高压灭菌后4℃保存。

LB固体平板：LB液体培养基中加入15 g/L琼脂粉，灭菌后冷却至50-55℃，按质粒抗性加入抗生素（如氨苄青霉素至终浓度100 μg/mL），混匀后倒入无菌培养皿。

其他材料：预冷无菌离心管（1.5 mL）、无菌涂布棒、冰盒、计时器、水浴锅。

2. 质粒使用注意事项

将10 μL质粒按3 μL、3 μL、4 μL分装至3支离心管，每次转化仅用1管，避免污染和反复冻融。

若需稀释质粒，使用无菌TE缓冲液（pH 8.0）或超纯水。

三、转化实验步骤（全程无菌操作）

1. 感受态细胞解冻

从-80℃取出STABLE感受态细胞（如50 μL/管），避免手部直接接触感受态细胞，立即置于冰上静置5分钟，观察细胞悬液由浑浊变为半透明。

2. 质粒与感受态细胞混合

用移液器吸取50 ng质粒，缓慢加入感受态细胞中。轻弹管壁5次（避免产生气泡），确保质粒与细胞充分接触，冰浴静置30分钟。

3. 热激处理

提前预热水浴锅至42℃，将离心管垂直插入水浴锅中，热激45秒。立即取出离心管放回冰上，静置2分钟。

4. 复苏培养

向离心管中加入450 μL预热的LB液体培养基（不含抗生素），吹吸混匀3次（动作轻柔）。置于37℃摇床，200 rpm振荡培养1.5-2小时（STABLE菌需延长复苏时间以修复细胞壁）。

5. 涂布与培养（关键步骤）

将100 μL复苏菌液滴加到含抗生素的LB平板中央。用无菌涂布棒倾斜45°，沿同一方向均匀涂开，静置5分钟待液体吸收。倒置平板，37℃培养16-24小时。

备用方案：

若转化效率低将菌液离心（4000 rpm，4℃，1分钟），小心弃去400 μL上清（枪头勿触碰管底沉淀）。用剩余50 μL培养基轻柔重悬菌体（可上下吹吸10次）并涂布，培养条件同上。

四、阳性克隆鉴定（必做步骤）

菌落筛选：挑取3-5个单菌落，分别接种至5 mL含抗生素的LB液体培养基，37℃振荡培养12小时。

质粒提取：使用试剂盒（如QIAGEN Plasmid Mini Kit）提取质粒，测定浓度（预期>50 ng/μL）。

酶切鉴定：选择质粒上的单一酶切位点（如EcoRI），37℃酶切1小时后跑胶，确认条带大小是否符合预期。

测序验证：针对慢病毒载体关键区域（如U6、WPRE）设计引物，送测序公司验证序列完整性。

五、疑难解答

1. 无克隆生长：抗生素失效/浓度错误，用空载体质粒验证平板有效性。
2. 克隆过多但大小不一：质粒重组或宿主菌污染，更换STABLE菌株，重新提取质粒验证。
3. 背景杂斑：涂布不均匀或抗生素浓度不足，增加抗生素浓度至1.5倍

声明：本产品含慢病毒元件，严禁用于基因治疗或人体实验，违反者责任自负。